

Aus dem Institut für Radiologie
der Universität Erlangen-Nürnberg
Direktor: Professor Dr. med., Dr. phil. nat. H. Pauly

Der mittlere Aktivitätskoeffizient von NaCl
in konzentrierten
Rinderserumalbuminlösungen

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
dem Fachbereich Medizin
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg

vorgelegt von
Detlef Rämisch
aus Münchberg

1976



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Institut für Radiologie
der Universität Erlangen-Nürnberg
Direktor: Professor Dr. med., Dr. phil. nat. H. Pauly

Der mittlere Aktivitätskoeffizient von NaCl in konzentrierten Rinderserumalbuminlösungen



Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
dem Fachbereich Medizin
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg

vorgelegt von
Detlef Rämisch
aus Münchberg

Gedruckt mit Erlaubnis des Fachbereichs Medizin
der Universität Erlangen-Nürnberg



Dekan:	Prof. Dr. E. Rügheimer
Referent:	Prof. Dr. Dr. H. Pauly

Tag der mündlichen Prüfung: 23. Dezember 1976

Meiner Frau Heike

1	EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG	1
2	METHODIK	5
2.1	Theorie der Messung	5
2.2	Das RSA-Molekül	13
2.3	Herstellung der RSA-NaCl-Lösungen	15
2.4	Titrationenlösungen	17
2.5	Meßanordnung	18
2.5.1	Meßzelle	20
2.5.2	Ionenaustauschermembranen	22
2.5.3	KCl-Brücken und -Elektroden	23
2.5.4	Elektrische Meßgeräte	24
2.6	Meßvorgang	25
2.6.1	Bestimmung der mittleren Aktivität	25
2.6.2	Überprüfung mit reinen NaCl-Lösungen	28
3	ERGEBNISSE	30
	Der stöchiometrische mittlere Aktivitäts- koeffizient	
4	DISKUSSION	38
4.1	Berücksichtigung der Protein-Wasser- Wechselwirkung	40
4.2	Berücksichtigung der spezifischen Cl^- - Ionenbindung an das RSA-Molekül	42
4.3	Die elektrostatische Wechselwirkung des RSA-Moleküls mit den Na^+ - und Cl^- -Ionen	45
5	FEHLERBETRACHTUNG	53
6	ZUSAMMENFASSUNG UND SCHLUSFOLGERUNG	56
7	LITERATUR	58

1 EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG

Die Erforschung des physikalisch-chemischen Zustandes des Zytoplasmas lebender Zellen ist Gegenstand zahlreicher Untersuchungen. Während es sich bei der Extrazellulärflüssigkeit um eine wässrige Lösung von Proteinen, Salzen und anderen Molekülen handelt, bestehen über den thermodynamischen Zustand der intrazellulären molekularen Bestandteile noch unterschiedliche Auffassungen. Umstritten ist dabei vor allem das Verhalten der kleinen Ionen, dessen Kenntnis zur Erklärung vieler Zellphänomene, wie zum Beispiel der Potentialbildung an den Zellmembranen, des Stoffaustausches und Ionentransports durch die Zellmembran und innerhalb der Zelle, unentbehrlich ist.

Beim Zytoplasma handelt es sich um ein Mehrkomponentensystem, bestehend aus Wasser (70 - 85 Gewichtsprozent), Proteinen (10 - 20 Gewichtsprozent), Lipiden, Nukleinsäuren, Kohlehydraten, anderen kleinen organischen Molekülen und anorganischen Salzen (1 - 2 Gewichtsprozent). Das intrazelluläre Milieu wird dabei entsprechend dem Gewichtsanteil und der Molekülzahl hauptsächlich durch Wasser, dann durch die Proteine, die auch aufgrund ihrer zahlreichen Ladungsgruppen einen wichtigen Anteil stellen, und schließlich durch die kleinen anorganischen Ionen wie K^+ , Na^+ , Ca^{++} , Mg^{++} , Cl^- und HCO_3^- bestimmt, welche trotz ihres geringen Gewichtsanteils insgesamt eine Konzentration von 0,1 bis 0,3 Mol pro Kilogramm Zellwasser bei allen bekannten tierischen und pflanzlichen Zellen aufweisen. Die übrigen Anteile treten mengenmäßig in den Hintergrund oder sind, wie zum Beispiel die Lipide, an Membranstrukturen gebunden.

Gemäß dieser Zusammensetzung liegt es zunächst nahe, das Zytoplasma als wässrige Lösung aufzufassen, worauf auch Messungen der intrazellulären Leitfähigkeit mit hochfrequenten Wechselströmen von PAULY [32 -36] , der Diffusionsgeschwindigkeit kleiner Ionen und Moleküle in der Zelle [7,22] und der kalorischen Eigenschaften des Zellwassers [4, 30, 18] hindeuten. Demgegenüber stehen jedoch die "association-induction"-Hypothese von LING [23 - 26] und die Sorptionstheorie von TROSCHEIN [57] , die beide dem Zytoplasma aufgrund eines hohen Wasserbindungsvermögens der Proteine eine festkörperähnliche Struktur zuschreiben; die kleinen Ionen sollen demnach nicht mehr frei beweglich, sondern in einem netzwerkähnlichen System fixiert sein.

Die vorliegende Arbeit soll einen Beitrag zum Verständnis des thermodynamischen Zustands der kleinen Ionen im Zytoplasma liefern, wobei vom Lösungsmodell des Zytoplasmas ausgegangen wird. Als Untersuchungsobjekt dient eine Modelllösung des Zytoplasmas mit entsprechender molekularer Zusammensetzung, wobei vorausgesetzt wird, daß die Bedingungen in lebenden Zellen annähernd dieselben sind. Untersucht wird darin die Wechselwirkung von Na^+ - und Cl^- -Ionen mit Rinderserumalbumin (RSA)-Molekülen in wässriger Lösung. Als Maß für den Einfluß des Proteins auf die kleinen Ionen dient der Aktivitätskoeffizient des gelösten Salzes im Vergleich zu dem reiner Salzlösungen gleicher Konzentration.

Derartige Messungen der Wechselwirkung von kleinen Ionen mit Proteinmolekülen sind bereits mehrfach durchgeführt worden. Eine zusammenfassende Darstellung findet sich bei STEINHARDT und REYNOLDS [51] . In den dort beschriebenen Untersuchungen waren jedoch die Proteinkonzentratio-

nen zu niedrig, um Rückschlüsse auf die Verhältnisse im Zytoplasma ziehen zu können. Erst in jüngerer Zeit wurden Messungen an hochkonzentrierten Proteinlösungen durchgeführt, so zum Beispiel an Hämoglobin/NaCl-Lösungen von TRETTER [58], Hämoglobin/KCl-Lösungen von MENGES [29] und RSA/KCl-Lösungen von PFISTER [37]. Sie ergaben im physiologischen Konzentrationsbereich eine Änderung des Aktivitätskoeffizienten, bezogen auf den Wert in einer reinen Salzlösung gleicher Konzentration, bis ca. 10%, was bedeutet, daß der Einfluß des Proteins auf den thermodynamischen Zustand der kleinen Ionen insgesamt relativ klein ist.

Schon bei den bisherigen Arbeiten wurde als Ursache für die Beeinflussung des Aktivitätskoeffizienten die Verminderung des freien Lösungsraumes durch Wasserbindung, die selektive Cl⁻-Ionen-Bindung an das Protein und die elektrostatische Wechselwirkung zwischen Proteinen und Salzionen diskutiert. Während beim Hämoglobin-Molekül aus der Änderung des Aktivitätskoeffizienten eine Unterscheidung zwischen selektiver Cl⁻-Ionenbindung und elektrostatischem Effekt seitens des Proteins nicht möglich war, konnte beim RSA-Molekül der elektrostatische Effekt abgetrennt werden, da hier die Zahl der selektiv gebundenen Cl⁻ Ionen aus Literaturwerten errechnet werden konnte.

Die elektrostatische Wechselwirkung zwischen Proteinen und Salzionen wird einerseits durch die Bilanzladung des Proteins, zu der auch die gebundenen Cl⁻-Ionen beitragen, verursacht, andererseits durch den Abschirmeffekt der in der näheren Umgebung befindlichen Salzionen gemindert. Wie stark sich diese beiden Komponenten auswirken und welche von beiden überwiegt, hängt erwartungsgemäß sehr stark

von der Salzkonzentration ab. Aus diesem Grunde werden in der vorliegenden Arbeit die NaCl-Konzentrationen der Meßlösungen von 0,01 bis 0,5 Mol pro Kilogramm Lösungswasser variiert. Die Konzentrationen liegen damit im oberen und unteren Bereich außerhalb der physiologischen Konzentration von 0,1 bis 0,3 Mol pro Kilogramm Wasser. Der Anteil des RSA in den Lösungen blieb dagegen als Parameter konstant; er betrug entsprechend den Verhältnissen in lebenden Zellen 20 Gewichtsprozent.

Die Bestimmung des Aktivitätskoeffizienten des gelösten Salzes erfolgt durch Messung der Elektromotorischen Kraft (EMK) einer elektrochemischen Meßkette. Analog der Methode von SCATCHARD [46] werden hierzu Ionenaustauscher-"Membranelektroden" [49, 8] verwendet. Aus prinzipiellen thermodynamischen Gründen [15] ist dabei nur der mittlere Aktivitätskoeffizient meßbar; zusammen mit der Salzkonzentration kann hieraus das chemische Potential des Salzes errechnet werden.

2. METHODIK

2.1 Theorie der Messung

Das chemische Potential von NaCl in Lösung ist definiert durch die Gleichung

$$\mu_{\text{NaCl}} = \mu_{0,\text{NaCl}} + RT \cdot \ln a_{\text{NaCl}} \quad (1)$$

wobei μ_{NaCl} das chemische Potential,
 $\mu_{0,\text{NaCl}}$ das chemische Standardpotential von NaCl,
 R die allgemeine Gaskonstante,
 T die absolute Temperatur,
 a_{NaCl} die Aktivität des Salzes ist.

Die Aktivität des gelösten Salzes, a_{NaCl} , läßt sich darstellen als:

$$a_{\text{NaCl}} = \gamma_{\text{NaCl}} \cdot m_{\text{NaCl}} \quad (2)$$

wobei γ_{NaCl} der Aktivitätskoeffizient von NaCl,
 m_{NaCl} die molale Konzentration der Salzlösung bedeutet.

Als symmetrischer Elektrolyt dissoziiert NaCl in gleich-

viele Anionen Cl^- und Kationen Na^+ . Da die Aktivität der Einzelionen jedoch nicht meßbar ist, definiert man die mittlere (Ionen-) Aktivität $a_{\pm}$ beider Ionensorten als das geometrische Mittel der Einzelionenaktivitäten.

Der Zusammenhang zwischen a_{NaCl} und $a_{\pm}$ ist gegeben durch die Gleichung:

$$a_{\pm} = \sqrt{a_{\text{Na}^+} \cdot a_{\text{Cl}^-}} = \sqrt{a_{\text{NaCl}}} \quad (3)$$

Analog zu Gl. (3) definiert man sinnvoller Weise auch einen mittleren (Ionen-) Aktivitätskoeffizienten ($\gamma_{\pm}$) und eine mittlere Ionenkonzentration $m_{\pm}$ und erhält dann:

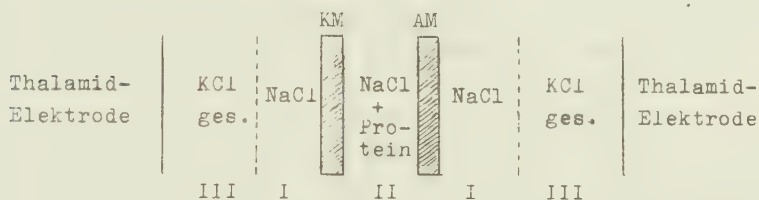
$$a_{\pm} = \gamma_{\pm} \cdot m_{\pm} \quad (4)$$

$\gamma_{\pm}$ läßt sich mittels der elektromotorischen Kraft (EMK) an einer galvanischen Zelle mit geeigneten Elektroden messen. Der mittlere Aktivitätskoeffizient stellt somit eine meßbare Größe dar, mit deren Hilfe nach (4) und (1) bei bekannter Konzentration m_{NaCl} und konstantem Druck und konstanter Temperatur das chemische Potential einer NaCl-Lösung errechnet werden kann.

Die EMK einer galvanischen Zelle ist definiert als die elektrische Potentialdifferenz E , die in stromlosem Zustand zwischen den Elektroden einer galvanischen Zelle

abgegriffen wird, was mittels einer Kompensationsspannung möglich ist.

Im folgenden Fall wurde eine galvanische Zelle mit Ionenaustauschermembranen (s. 2.5.2) und Thalamid-Elektroden (s. 2.5.3) verwendet:



Die Phasen I stellen reine NaCl-Lösungen mit identischen Konzentrationen dar, Phase II eine Proteinlösung mit NaCl und Phase III gesättigte KCl-Lösungen, in die jeweils eine Cl^- -reversible Thalamidelektrode eintaucht. Die Phasen II und I sind einerseits durch eine Anionenaustauschermembran AM, andererseits durch eine Kationenaustauschermembran KM getrennt. An diesen bildet sich, bedingt durch die unterschiedlichen Konzentrationen bzw. Aktivitäten der Lösungen in Phase I und II, eine elektrische Potentialdifferenz aus, die über KCl-Salzbrücken (s. 2.5.3) (= Phase III) stromlos abgegriffen wird.

Den Zusammenhang zwischen der EMK und $\gamma_{\pm}$ bzw. $a_{\pm}$ zeigt die folgende Betrachtung der thermodynamischen Verhältnisse an unserer galvanischen Zelle.

Die EMK E ist bei konstantem Druck in jeder Phase und konstanter Temperatur bestimmt durch folgende Beziehung [16] :

$$F E = -\Delta G \quad (5)$$

wobei F die Faraday-Konstante,
 E die EMK,
 ΔG die Änderung der freien Enthalpie bedeutet.

Das Produkt $F \cdot E$ ist die im äußeren Stromkreis geleistete elektrische Arbeit, wenn 1 Mol elektrische Elementarladungen über die Potentialdifferenz E reversibel verschoben wird. Diese Arbeit ist gleich der Abnahme der freien Enthalpie in der elektrochemischen Zelle bei einem isothermen reversiblen Prozeß.

Die Abnahme der freien Enthalpie beruht in unserem speziellen Fall allein auf Ionen- und Wasser-Überführung durch die Membranen, da die Beiträge durch die Überführung zwischen den Phasen I und III und die Elektrodenreaktionen sich gegenseitig aufheben. Für die Membranen wird vorausgesetzt, daß sie vollständig mit Na^+ - bzw. mit Cl^- -Ionen beladen sind, die Überführung von H^+ , OH^- und H_2O hinsichtlich der Änderung der freien Enthalpie vernachlässigt werden kann und daß sie proteinundurchlässig sind. Somit gilt für die Änderung der freien Enthalpie der Zelle durch Überführung von Ionen durch die

Membranen beim Transport von positiver elektrischer Ladung von links nach rechts:

$$\Delta G = n_{Na^+}^K \cdot (\mu_{Na^+}^{II} - \mu_{Na^+}^I) + n_{Cl^-}^K \cdot (\mu_{Cl^-}^{II} - \mu_{Cl^-}^I) + n_{Na^+}^A \cdot (\mu_{Na^+}^I - \mu_{Na^+}^{II}) + n_{Cl^-}^A \cdot (\mu_{Cl^-}^I - \mu_{Cl^-}^{II}) \quad (6)$$

wobei	$n_{Na^+}^K$; $n_{Na^+}^A$	die Anzahl der von links nach rechts überführten Mole Natriumionen durch die Kationen- bzw. Anionenaustauschermembran,
	$n_{Cl^-}^K$; $n_{Cl^-}^A$	die Anzahl der von links nach rechts überführten Mole Chloridionen durch die Kationen- bzw. Anionenaustauschermembran,
	$\mu_{Na^+}^I$; $\mu_{Na^+}^{II}$	das chemische Potential der Natriumionen in den Phasen I und II und
	$\mu_{Cl^-}^I$; $\mu_{Cl^-}^{II}$	das chemische Potential der Chloridionen in den Phasen I und II ist.

Findet ein Transport von insgesamt einem Mol positiver elektrischer Ladung durch die Zelle von links nach rechts statt, ist die Anzahl der überführten Ionen bis auf das Vorzeichen definitionsgemäß gleich den mittleren Überführungszahlen $\bar{t}_i$ der betreffenden Ionensorte in den Austauschermembranen, wobei

$$\begin{aligned} n_{Na^+}^K &= \bar{t}_{Na^+}^K, \\ n_{Cl^-}^K &= -\bar{t}_{Cl^-}^K, \\ n_{Na^+}^A &= \bar{t}_{Na^+}^A \quad \text{und} \\ n_{Cl^-}^A &= -\bar{t}_{Cl^-}^A \quad \text{ist.} \end{aligned}$$

Weiterhin gilt die Beziehung:

$$\sum_i \bar{t}_i = 1 \quad (7)$$

Durch Einsetzen in Gl. (6) und entsprechender Umformung erhält man:

$$\Delta G = (1 - \bar{t}_{Na^+}^A - \bar{t}_{Cl^-}^K) \cdot (\mu_{NaCl}^{II} - \mu_{NaCl}^I) \quad (8)$$

μ_{NaCl}^I und μ_{NaCl}^{II} stellen dabei das chemische Potential von NaCl in den Phasen I und II dar. Unter Anwendung von Gl. (1), (3) und (5) auf Gl. (8) findet man schließlich:

$$E = -\frac{2RT}{F} \cdot (1 - \bar{t}_{Cl^-}^K - \bar{t}_{Na^+}^A) \cdot \ln \frac{a_{\pm}^{II}}{a_{\pm}^I} \quad (9)$$

wobei	E	die elektromotorische Kraft,
	R	die universelle Gaskonstante,
	T	die absolute Temperatur,
	F	die Faraday-Konstante,
	$\bar{t}_{Cl^-}^K$	die mittlere Überföhrungszahl für Chloridionen in der Kationenaustauschermembran,
	$\bar{t}_{Na^+}^A$	die mittlere Überföhrungszahl für Natriumionen in der Anionenaustauschermembran und
	a_{+}^I, a_{+}^{II}	die mittlere Aktivität von NaCl in den Phasen I bzw. II bedeuten.

Die in der galvanischen Zelle verwendeten Membranen sollen im Idealfall eine Überföhrung von Coionen durch die Membran verhindern; die mittleren Überföhrungszahlen der Coionen sind dann gleich Null und Gl. (9) geht über in:

$$E = - \frac{2RT}{F} \cdot \ln \frac{a_{+}^{II}}{a_{+}^I} \quad (10)$$

Die Membrangrenzflächen verhalten sich dann wie je zwei reversible Natrium- bzw. Chloridelektroden, weshalb man auch die Bezeichnung "Membranelektroden" [45] verwendet.

Da sich die Membranelektroden in der Praxis nicht wie ideale Membranen verhalten, und eine - wenn auch geringe - Überföhrung von Coionen durch die Membran erfolgt, findet Gl. (9) als theoretische Grundlage für die Messungen in dieser Arbeit Anwendung.

Die mittleren Überföhrungszahlen $\bar{t}_i$ sind nicht mit hinreichender Genauigkeit bekannt. Die mittlere Aktivität $a_{\pm}$ kann aus diesem Grunde nicht unmittelbar aus Gl. (9) errechnet werden. Diese Schwierigkeit könnte umgangen werden, indem man mit Lösungen bekannter Aktivitäten eine Eichkurve erstellt, mit deren Hilfe $a_{\pm}^{\text{II}}$ ermittelt werden könnte. Um jedoch höhere Genauigkeit zu erreichen, bedienen wir uns der von SOLLNER beschriebenen Nulltitrationemethode [49], bei der mehrere Messungen mit jeweils unterschiedlichen NaCl-Aktivitäten in den Phasen I durchgeführt werden, die die zu erwartende NaCl-Aktivität in Phase II miteinschließen. Man erhält dabei für E positive und negative Werte. Als Funktion von $\log(a_{\pm}^{\text{I}})$ ergeben diese Werte auf halblogarithmischem Papier graphisch dargestellt eine Gerade, sodaß durch lineare Interpolation (rechnerisch mit Hilfe eines Tischrechners oder graphisch, siehe Abb. 3) der Wert $a_{\pm}^{\text{I}}$ für E = 0 ermittelt werden kann. Dabei gilt für E = 0 nach Gl. (9):

$$(a_{\pm}^{\text{I}})_{E=0} = a_{\pm}^{\text{II}} \quad (11)$$

Voraussetzung für die lineare Beziehung zwischen E und $\log(a_{\pm}^{\text{I}})$ ist, daß die Ionen-Überföhrungszahlen $\bar{t}_{\text{Cl}^-}^{\text{K}}$ und $\bar{t}_{\text{Na}^+}^{\text{A}}$ in den Membranen innerhalb der für die jeweilige Titration gewählten Konzentrationsbereiche konstant bleiben, sodaß der in den Klammern stehende Ausdruck in Gl. (9) zu einem konstanten Faktor wird. Dies ist, wie die Praxis gezeigt hat, hinreichend gut der Fall (s. 2.6), wenn das Verhältnis der NaCl-Konzentrationen links und rechts der Membranen den Wert 1 : 1,7 nicht übersteigt.

2.2 Das RSA-Molekül

Abgesehen von der physiologischen Bedeutung und der relativ problemlosen Lösungsaufbereitung bietet sich das Hinderserumalbumin auch wegen seiner weitgehend bekannten molekularen Eigenschaften als Untersuchungsmaterial an.

Hinderserumalbumin (Molekulargewicht $M_{RSA} = 69000$ [40]) ist sehr gut wasserlöslich. In Lösung liegt das RSA-Molekül als Polyion mit ca. 200 geladenen Gruppen - hauptsächlich Carboxyl- und Aminogruppen - mit einer ein bis zwei Molekülschichten betragenden Hydrathülle vor und besitzt bei pH-Werten zwischen 4,3 und 10,5 annähernd stabile kugelförmige Gestalt mit einem Radius von etwa $33 \text{ \AA}$ [27, 53 - 56] . Der pH-Wert in wässriger Lösung liegt bei der hier verwendeten Konzentration von 20 Gewichtsprozent bei 4,4 und bei Anwesenheit von NaCl je nach Konzentration zwischen 5 und 5,5.

Über die Elektroneutralitätsbedingung läßt sich die mittlere Titrationsladungszahl Z_0 der RSA-Moleküle berechnen:

$$Z_0 = \frac{m_{Cl^-} - m_{Na^+} + m_{OH^-} - m_{H^+}}{m_{RSA}} \quad (12)$$

Da es sich bei den hier vorkommenden Lösungen um isotonische Salzlösungen handelt, wird der Zahlenwert von Z_0 durch den pH-Wert und durch m_{RSA} bestimmt. Bei dem

durchschnittlichen pH-Wert von 5 und der konstanten RSA-Molalität von $3,623 \cdot 10^{-3}$ ergibt sich für Z_o der Wert $-2,76 \cdot 10^{-3}$, d.h. Z_o ist praktisch gleich Null.

Die Titrationsladungszahl Z_o ist jedoch nicht gleich der mittleren Ladungszahl Z_{RSA} des RSA-Moleküls, da dieses eine starke Bindungsaffinität gegenüber kleinen Anionen besitzt; einwertige Kationen werden dagegen nicht gebunden [13]. Die Zahl der im Mittel pro RSA-Molekül gebundenen Cl^- -Ionen, ν_{Cl^-} , hängt vom pH-Wert der Lösung (hier konstant) und von der Konzentration der Cl^- -Ionen ab. Die Werte von ν_{Cl^-} konnten für die jeweilige NaCl-Konzentration aus Literaturwerten errechnet werden; sie sind auf S.44 in Tabelle 5 aufgeführt. Für die mittlere Ladungszahl pro RSA-Molekül gilt somit die Beziehung:

$$Z_{RSA} = Z_o - \nu_{Cl^-} \approx -\nu_{Cl^-} \quad (13)$$

Die RSA-Lösung enthält zu ca. 10% dimeres und zu ca. 4% polymeres RSA [37, 3, 17, 20, 21, 50]; diese entstehen wahrscheinlich bei der Herstellung des Präparates. Bei der Konzentrationsberechnung wurde das gesamte RSA als monomere Fraktion behandelt.

2.3 Die Herstellung der RSA-NaCl-Lösung

Die Herstellung der RSA-Lösung geschah nach der bei PFISTER [37] beschriebenen Methode. Zunächst wurde mit trockenem kristallinem RSA ("Serumalbumin vom Rind, trocken, reinst" der Behring-Werke, Marburg) und demineralisiertem Wasser (spez. Leitfähigkeit ca. $10^{-7} \Omega^{-1} \text{ cm}^{-1}$) bei 25°C eine ca. 10%ige Stammlösung angesetzt. Zur Eliminierung der darin noch enthaltenen Fremdsalze wurde die Lösung zweimal durch eine Mischbett-Ionen-austauschersäule (Serdolit M-B) bei 4°C geleitet. Anschließend wurde die entionisierte Stammlösung ultrafiltriert (Ultrafiltrationsgerät SM 165 25 mit Membranpumpe SM 16896, Fa. Sartorius Membranfilter GmbH, Göttingen., nähere Beschreibung bei TRETTER [58]) und damit bis ca. 25 Gewichtsprozent RSA konzentriert.

Der genaue RSA-Anteil der erhaltenen Lösung wurde durch die Trockengewichtsbestimmung ermittelt, indem zwei Proben von ca. 1 - 2 Gramm Gewicht bei 110°C getrocknet wurden, bis sich nach ca. 20 Stunden Gewichtskonstanz einstellte. Durch Verdünnung mit demineralisiertem H_2O konnte dann der RSA-Anteil auf 20 Gewichtsprozent korrigiert werden unter Anwendung der Beziehung:

$$G_{\text{H}_2\text{O}} = \frac{f}{0,2} - 1 \quad (14)$$

wobei G_{H_2O} die pro Gramm Ausgangslösung hinzuzugebende Verdünnungsmenge in Gramm an demineralisiertem H_2O , und
 ξ der Trockengewichtsanteil des RSA an der Ausgangslösung bedeutet.

Nimmt man an, daß das gesamte RSA als monomere Fraktion mit dem Molekulargewicht $m_{RSA} = 69000$ [40] vorliegt, so errechnet sich dann nach

$$m_{RSA} = \frac{1000 \xi}{(1 - \xi) m_{RSA}} \quad (15)$$

eine RSA-Molalität der Lösung von $m_{RSA} = 3,623 \cdot 10^{-3}$ mol/kg. Der relative Fehler der RSA-Molalität beträgt dabei 0,5 %, bedingt durch den Fehler der Trockengewichtsbestimmung.

Die spezifische Leitfähigkeit der Endlösung lag bei 23°C zwischen 8,2 und 13,4 $\mu S/cm$, der pH-Wert zwischen 4,24 und 4,41 (Radiometer-pH-Meter, Typ 25 SE, der Firma Radiometer, Kopenhagen). Da diese Werte den von PFISTER [37] gefundenen entsprachen, wurde auf eine weitere Analyse der RSA-Lösung verzichtet.

Die gewonnene 20 %ige RSA-Lösung wurde nun in mehrere Portionen aufgeteilt, in welchen durch Einwägung von getrocknetem NaCl neun verschiedene NaCl-Molalitäten von 0,01 bis 0,5 Mol NaCl pro Kilogramm H_2O mit einer Genauigkeit von ca. ± 1 % eingestellt wurden.

2.4 Die Titrationslösungen

Für die Nulltitration jeder RSA-NaCl-Lösung wurden je fünf reine NaCl-Lösungen angesetzt, die erfahrungsgemäß in der Meßzelle den Spannungswert $E = 0$ einschlossen. So wurde z.B. für die RSA-Lösung mit 0,01 Mol NaCl pro Kilogramm Wasser eine Titrationsreihe von 0,0042, 0,005, 0,006, 0,007 und 0,0085 Mol NaCl pro Kilogramm Wasser hergestellt, für die RSA-Lösung mit der NaCl-Molalität 0,5 die Reihe: 0,36, 0,42, 0,5, 0,6 und 0,7 Mol NaCl pro Kilogramm Wasser.

Die Lösungen wurden durch Einwägen von getrocknetem NaCl (NaCl Merck; Reinheitsgrad: p.A.) in demineralisiertes Wasser der spezifischen Leitfähigkeit von etwa $10^{-7} \Omega^{-1} \text{ cm}^{-1}$ bei 23°C hergestellt.

2.5 Die Meßanordnung

Die Messung der mittleren Aktivität wurde nach der Methode von PFISTER [37] mittels einer Dreikammerzelle mit zwei Ionenaustauschermembranen durchgeführt, wie sie im Prinzip bereits im Kapitel "Theorie der Messung" beschrieben wurde. Abb.1 zeigt die Meßanordnung schematisch:

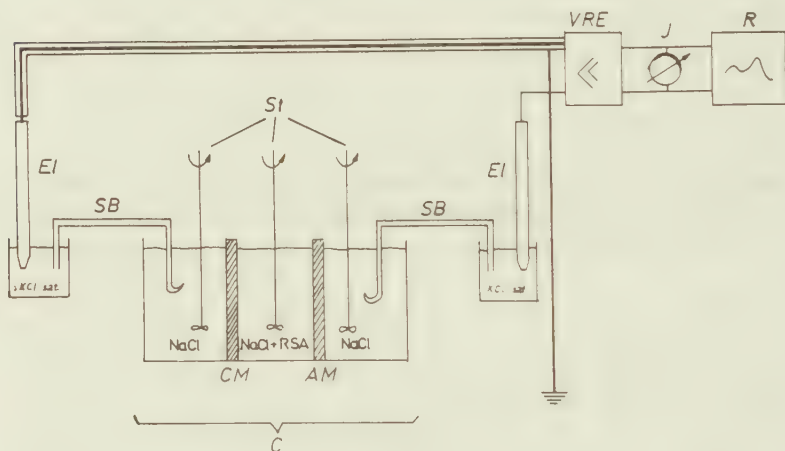


Abb. 1: Schematischer Aufbau der Meßanordnung zur Bestimmung der mittleren Aktivitäten von NaCl in RSA-NaCl-Lösungen mit Ionenaustauscher-Membranelektroden

- C: Dreikammer-Meßzelle;
- CM: Kationen-Austauschermembran;
- AM: Anionen-Austauschermembran;
- ST: Rührvorrichtung;
- SB: Salzbrücken (KCl, gesättigt, in Agar-Agar);
- El: Thalamid-Elektroden;
- VRE: Meßverstärker;
- J: Anzeigeelement;
- R: Potentiometerschreiber.

Die beiden Außenkammern ("NaCl") enthalten die erwähnten Titrationslösungen, während sich in der mittleren Kammer ("NaCl + RSA") die jeweils zu untersuchende RSA-NaCl-Lösung befindet. Die zu messende Potentialdifferenz wird von den Außenkammern mittels Salzbrücken (s.u.) abgegriffen, die über je ein Vorratsgefäß mit gesättigter KCl-Lösung ("sat. KCl") mit je einer Thalamidelektrode (s.u.) in Verbindung stehen. Von diesen erfolgt der weitere Spannungsabgriff mit einem Schwingkondensator-Meßverstärker (s.u.), an dem noch ein Kompensations-schreiber (Servogor, Firma Metrawatt) zur genauen Aufzeichnung der Werte angeschlossen ist. Die Entstehung von Diffusionspotentialen in den Flüssigkeitsfilmen an den Membranen [37] wurde durch fortgesetztes Rühren des Rührwerkes ST mit konstanter Rührgeschwindigkeit auf das erreichbare Minimum reduziert (s.u. "Meßvorgang und Bestimmung der mittleren Aktivität").

Die gesamte Meßanordnung mit Ausnahme des Meßverstärkers und des Schreibers war durch einen Faradayschen Käfig aus Maschendraht gegen äußere elektrische Beeinflussungen geschützt.

2.5.1 Meßzelle

Den Längsschnitt der Dreikammerzelle zeigt Abb. 2:

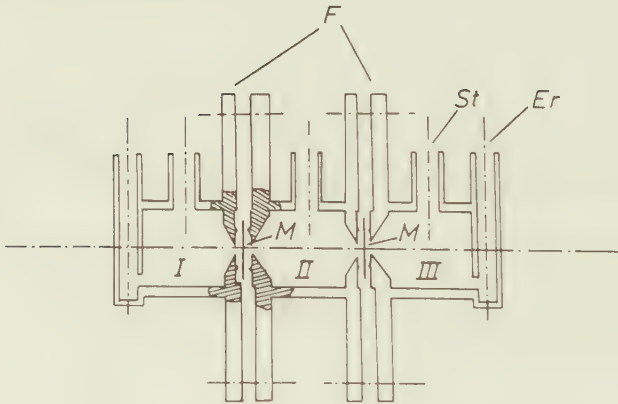


Abb. 2: Längsschnitt durch die Dreikammer-Meßzelle (schematisch):

Querschnitt:	zylindrisch;
Material:	Plexiglas;
F:	Flasche;
St:	Einfüllstutzen;
Er:	Elektrodenräume;
M:	Ionenaustauschermembranen;
I, II, III:	Meßkammern.

Die Zelle*) läßt sich in drei einzelne Kammern zerlegen. Die drei Kammern werden in ihrer Längsachse durch vier lange Plastiksrauben fest miteinander verbunden. Die Abdichtung erfolgt mit Hartgummiringen, die in die einander zugekehrten Seiten der Kammern eingelassen sind. Dazwischen eingeklemmt befinden sich die beiden Austauschermembranen, die somit die Innenräume der drei Kammern von einander abtrennen. Rechts und links am Außenrand der äußeren Kammern befinden sich Kamine, die mit diesen über Bohrungen von 2mm Durchmesser in Verbindung stehen und als Halterung für die KCl-Elektroden dienen. Jede Kammer besitzt oben einen Einfüllstutzen, durch welchen während der Messung auch die Rührstäbe eintauchen. Das Volumen der Kammern beträgt ca. 5 cm^3 , die Fläche der Membranfenster ca. $0,6 \text{ cm}^2$.

Auf die Stickstoffbegasung und die Temperatureinstellung mittels Wasserbad wurde verzichtet, da sie nach den Erfahrungen von PFISTER und MENGES keinen wesentlich verbessernden Einfluß auf die Meßgenauigkeit ausüben, zumal eine relativ gute Konstanz der Raumtemperatur ($23 \pm 1^\circ\text{C}$) bestand, und sich derartige geringe Änderungen von T nur in geringem Maße auf die Meßwerte auswirken, wie aus Gl. (9) zu ersehen ist.

*) Die Herstellung der Zelle besorgte Herr Lehmeier; für seine hilfsbereite Unterstützung in allen technischen Fragen möchte ich ihm an dieser Stelle danken.

2.5.2 Ionenaustauschermembranen

Bei den Ionenaustauschermembranen handelt es sich um Divinylbenzol-vernetzte und mit dem Stützgewebe "Dynel" verstärkte Polystyrolplatten der Firma IONICS Inc., Watertown, Mass., USA. Die Dicke der Membranen beträgt ca. 0,7 mm. Die Membranen tragen Festionen (SO_3^- -Ionen in der Kationenaustauschermembran, Typ Nepton CR 61, und tertiäre und quarternäre Ammoniumbasen in der Anionenaustauschermembran, Typ Nepton AR 111).

Vor der Verwendung wurden sie in konzentrierter NaCl-Lösung mit Na^+ - bzw. Cl^- -Ionen beladen und anschließend in NaCl-Lösungen, deren Konzentration der jeweils zu messenden NaCl-RSA-Lösung entsprach, äquilibriert und bei 4°C gelagert. So konnten für jede Nulltitration äquilibrierte Membranpaare verwendet werden.

Nähere Angaben über die Eigenschaften der Ionenaustauschermembranen sind bei PFISTER [37, 38] nachzulesen.

2.5.3 KCl-Brücken und -Elektroden

Die KCl-Brücken dienten zur elektrischen Verbindung der Außenkammern der Meßzelle mit den KCl-Vorratsgefäßen, in welche die Thalamid-Elektroden (Fa. Schott & Gen., Mainz) eintauchten. Die Salzbrücken bestanden aus PVC-Schläuchen mit einem Innendurchmesser von ca. 1 mm, die mit gesättigter KCl-Lösung gefüllt waren. Auf der Seite der Titrationslösungen mündeten die Schläuche in Glaskapillaren etwa gleichen Durchmessers, die am Ende zu Spitzen von etwa 100μ Innendurchmesser ausgezogen und nach oben U-förmig umgebogen waren, und gesättigte KCl-Lösung in 1,2 %igem Agar-Agar (Difco, purified agar) enthielten. Hierdurch und durch die Bindung der KCl-Lösung als Gel konnte der Übertritt von KCl in die Titrationslösung durch Diffusion, Konvektion und hydrostatische Druckunterschiede auf ein Minimum reduziert werden, sodaß der Einfluß auf die Messung vernachlässigt werden konnte.

2.5.4 Elektrische Meßgeräte

Die Potentialdifferenz wurde mit einem Schwingkondensator-Meßverstärker (F H T 408A der Firma Friesseke und Höepfner, Erlangen) gemessen. Durch den hohen Eingangswiderstand von $10^{11} \Omega$ ist der Idealfall der stromlosen EMK-Messung annähernd gegeben. Zur Erhöhung der Ablesegenauigkeit wurde die EMK nur im 10 mV-Bereich gemessen, indem alle auftretenden höheren Spannungen mit dem eingebauten Kompensator des F H T 408A stufenweise um jeweils 10 mV entsprechend der Eingangsspannung kompensiert wurden. Die Genauigkeit der Einstellung betrug dabei $\pm 0,1$ mV.

Die graphische Aufzeichnung der gemessenen Werte erfolgte mit dem Kompensationsschreiber "Servogor" der Firma Metrawatt, Nürnberg, mit einer Genauigkeit von $\pm 0,05$ mV, sodaß sich insgesamt mit der Genauigkeit der Kompensator-Einstellung eine maximale Meßunsicherheit von $\pm 0,15$ mV ergab.

2.6 Meßvorgang

2.6.1 Bestimmung der mittleren Aktivität

Nach Einlegen der für die jeweilige Messung entsprechend äquilibrierten Membranen in die Meßzelle wurde in die mittlere Kammer die zu untersuchende RSA-NaCl-Lösung, in die beiden äußeren Kammern nacheinander die fünf Titrationslösungen der zur NaCl-Molalität der jeweiligen RSA-Lösung passenden Titrationsreihe gefüllt. Angefangen wurde immer mit der niedrigsten NaCl-Molalität. Nach der Messung wurden die Außenkammern mit der nächst höhermolalen Titrationslösung erst gespült, dann gefüllt.

Die RSA-NaCl-Lösung in der Mittelkammer brauchte während der Titrationsfolge nicht ausgewechselt zu werden, da die während der Titration eintretende Änderung der NaCl-Konzentration durch Ionenüberführung an den Membranen vernachlässigbar war. Dies zeigten Kontrollversuche, bei denen nach dem Meßdurchgang die letzte Messung mit frischer RSA-NaCl-Lösung wiederholt wurde; die Abweichung der Meßwerte lag durchschnittlich bei $\pm 0,1$ mV und somit innerhalb der Meßunsicherheit (s.o.).

In die mit den Lösungen versehene Meßzelle wurden nun die Agar-KCl-Salzbrücken und die Rührstäbe getaucht und das Meßgerät und das Rührwerk eingeschaltet. Nach durchschnittlich ein bis zwei Minuten stellte sich ein nahezu konstanter Meßwert ein.

Da an den Elektroden und Salzbrücken Asymmetriespannungen auftraten (im Mittel um 0,5 mV), wurde jede Einzelmessung unter Vertauschung der beiden Agar-KCl-Salzbrücken doppelt ausgeführt und die Absolutbeträge der beiden Meßergebnisse gemittelt.

Die für jede Nulltitration gefundenen Werte wurden tabellarisch aufgezeichnet und in eine graphische Darstellung gebracht (s. Abb. 3). Die gemessenen EMK-Werte sind in Abhängigkeit vom dekadischen Logarithmus der NaCl-Aktivität der Bezugslösungen dargestellt. Die theoretische Grundlage für die gefundene lineare Abhängigkeit wurde bereits auf Seite 12 und 13 besprochen.

Auf dem Schnittpunkt der Geraden mit der Linie $E = 0$ läßt sich der gesuchte Wert für $(a_{\pm}^I)_{E=0}$ ablesen. Wie bereits erwähnt, wurden die Werte für $(a_{\pm}^I)_{E=0}$ in der vorliegenden Arbeit durch lineare Regression mit Hilfe eines Tischcomputers errechnet.

Abb. 3 zeigt als Beispiel für eine Aktivitätsbestimmung die Nulltitration einer 0,03 molalen NaCl-/20 %igen RSA-Lösung.

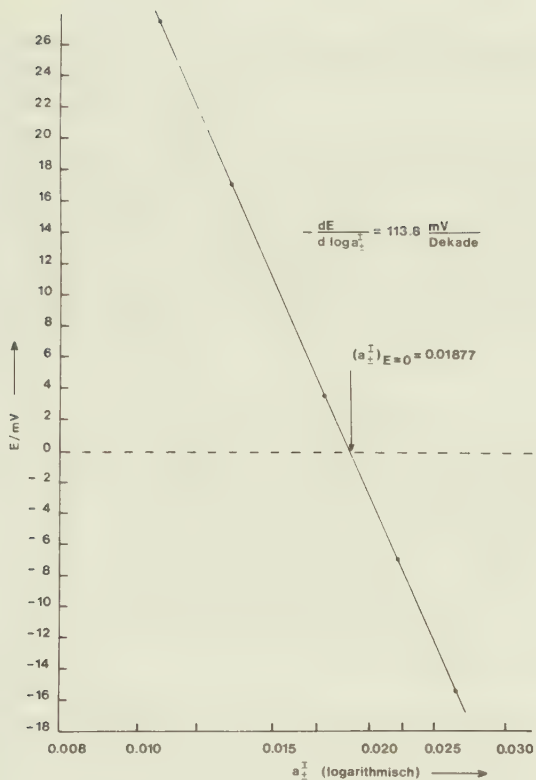


Abb. 3: Potentiometrische "Nulltitration" einer 0,03 molalen NaCl-/20 %igen RSA-Lösung:

E: Elektromotorische Kraft EMK der Meßzelle.
 $a_{\pm}^I$: Mittlere Aktivität von NaCl in den Außenkammern (Titrationslösungen).
 $\frac{dE}{d \log a_{\pm}^I}$: Steigung in Millivolt pro Dekade.

Alle Messungen wurden unter gleichmäßigem Rühren in allen Kammern und bei einer Raumtemperatur von $23 \pm 1^\circ \text{C}$ durchgeführt.

2.6.2 Die Überprüfung der Meßmethode

Die Genauigkeit der Meßmethode wurde durch Verwendung von reinen NaCl-Lösungen bekannter Molalität im Mittelkompartiment erprobt. Die Abweichung der ermittelten Meßwerte ($a_{\pm}^I$) vom Sollwert betrug im Mittel $+ 0,7 \%$ bei einer Reproduzierbarkeit der Meßwerte von $0,8 \%$. Bei den Messungen mit NaCl-RSA-Lösungen im Mittelkompartiment lag die Reproduzierbarkeit der Werte bei $\pm 0,9 \%$.

Die mittleren statistischen Abweichungen der einzelnen EMK-Werte von den Ausgleichsgeraden betrugen bei den Messungen sowohl mit reinen NaCl-Lösungen als auch mit RSA-NaCl-Lösungen durchschnittlich $\pm 0,3$ mV. Die lineare Abhängigkeit von E und $\log a_{\pm}^I$ war somit bei den gewählten Meßbereichen innerhalb der Meßgenauigkeit gegeben (vergl. S. 13). Der mittlere Fehler in $(a_{\pm}^I)_{E=0}$ errechnet sich aus diesem Wert zu $\pm 0,6 \%$ bis $\pm 0,9 \%$ (s. auch Kapitel 5).

Die Steigungen der Ausgleichsgeraden bei den Nulltitrationen mit und ohne RSA in der Mittelzelle waren jeweils bei gleichen Titrationsbereichen annähernd gleich. Voraussetzung dafür war das ausreichende Rühren der Meßlösungen mittels des Rührwerkes bei den Titrationen mit RSA. Wie bei PFISTER [37] näher ausgeführt, werden dadurch die Flüssigkeitsfilme auf den Membranen weitgehend beseitigt, die sonst wegen der dort entstehenden Diffusionspotentiale einen verändernden Einfluß auf die Steigung hätten.

Unterschiedliche Steigungen zeigten sich beim Vergleich der Nulltitrationen verschiedener Konzentrationsbereiche

in der Weise, daß bei steigenden NaCl-Molalitäten im Mittelkompartiment die Steigung der Ausgleichsgeraden abnahm, unabhängig davon, ob es sich um eine Titration mit reiner NaCl-Lösung oder mit NaCl-RSA-Lösung handelte. Die Ursache hierfür liegt in der Zunahme der mittleren Coionen-Überföhrungszahlen $\bar{t}_{Cl^-}^k$ und $\bar{t}_{Na^+}^A$ in den Ionen-austauschermembranen bei höheren NaCl-Molalitäten in den angrenzenden Lösungen. Dies hat, wie die Betrachtung von Gl. (9) deutlich macht, zwar einen Einfluß auf die Steigung der Geraden, nicht aber auf den Wert für $a_{\pm}^I$ bei $E = 0$.

Tabelle 1: Vergleich der Steigungen von Titrationsgeraden mit reinen NaCl-Lösungen und mit RSA-NaCl-Lösungen gleicher NaCl-Konzentration im Mittelkompartiment in Abhängigkeit von der NaCl-Konzentration.

$\frac{m_{NaCl}}{mol \cdot kg^{-1}}$	$\frac{dE/d \log a_{\pm}}{mV/Dekade}$	
	ohne RSA	mit 20%igem RSA im Mittelkompartiment
0,01	115,1	113,1 $\pm 3,3$
0,03	-	112,8 $\pm 1,9$
0,05	-	110,7 $\pm 0,6$
0,07	-	110,5 $\pm 1,1$
0,10	105,3	105,4 $\pm 1,3$
0,30	-	89,9 $\pm 0,8$
0,50	77,2	76,6 $\pm 0,7$

3. ERGEBNISSE

Der stöchiometrische mittlere Aktivitätskoeffizient

Die durch die Nulltitration gefundenen Werte für die Aktivität der RSA-NaCl-Lösung zeigten, daß die Aktivität gegenüber einer reinen NaCl-Lösung gleicher NaCl-Molalität verändert war. Das chemische Potential der NaCl-Lösung wurde also durch die Protein-Polyionen beeinflusst. Dies wird im Folgenden durch den mittleren Aktivitätskoeffizienten des Salzes in Protein-Wasser-Lösung im Vergleich zu demjenigen der reinen Salzlösung gleicher NaCl-Molalität dargestellt.

Zur Berechnung von γ^* aus $(a_{\pm}^I)_{c=0}$ benötigt man nach Gl. (4) die Ionenkonzentrationen in der Proteinlösung. Der physikalischen Bedeutung des "molalen" Aktivitätskoeffizienten nach sollten in den Ionenkonzentrationen nur diejenigen Ionen gezählt werden, die "frei", d.h. als eigene kinetische Einheiten in der Lösung vorliegen, und nur die Menge an Lösungsmittel berücksichtigt werden, die ihnen "wirklich" als Lösungsraum zur Verfügung steht. Diese "wahren" Ionenkonzentrationen müssen aus den chemisch bestimmten Einwaagekonzentrationen unter Verwendung von plausiblen und empirisch gesicherten Modellbetrachtungen bestimmt werden (s. Abschnitt 4). Zunächst jedoch werden alle Ionen als "frei" und das gesamte Wasser der Proteinlösung als verfügbares Lösungsmittel betrachtet. Die Ionenkonzentrationen werden hierbei den stöchiometrischen Einwaagekonzentrationen m_{NaCl}^I gleichgesetzt; γ wird dementsprechend "stöchiometrischer" mittlerer Aktivitätskoeffizient genannt.

*) Ab hier wird der Einfachheit halber für den mittleren Aktivitätskoeffizienten von NaCl in den RSA-NaCl-Lösungen das Symbol γ statt $\gamma_{\pm}^I$ verwendet.

Die Berechnung von γ erfolgt nach Gl. (4) und Gl. (11), wonach gilt:

$$\gamma = \frac{a_{\pm}}{m_{\pm}} = \frac{(a_{\pm}^I)_{E=0}}{m_{\pm}^I} \quad (16)$$

wobei γ der stöchiometrische mittlere molale Aktivitätskoeffizient von NaCl in der RSA-NaCl-Lösung,
 $(a_{\pm}^I)_{E=0}$ die gemessene mittlere Aktivität der NaCl-Lösungen in den Außenzellen bei $E=0$,
 $m_{\pm}^I$ die mittlere Ionenkonzentration von NaCl in der RSA-NaCl-Lösung in Mol pro Kilogramm Gesamtwasser ist.

Da analog zu Gl. (3) $m_{\pm} = \sqrt{m_{Na^+} \cdot m_{Cl^-}}$ (17)

und $m_{Na^+} = m_{Cl^-} = m_{NaCl}$ (18)

ist, gilt weiter: $\gamma = \frac{(a_{\pm}^I)_{E=0}}{m_{NaCl}}$ (19)

Abb. 4 und Tabelle 2 zeigen die gefundenen Werte für den stöchiometrischen mittleren molalen Aktivitätskoeffizienten von NaCl in RSA-NaCl-Lösungen in Abhängigkeit von der molalen NaCl-Konzentration der 20 %igen RSA-Lösung im Vergleich zum Aktivitätskoeffizienten reiner NaCl-Lösungen. Mit angegeben sind die Werte für die mittleren Aktivitätskoeffizienten von NaCl in reinen NaCl-Lösungen, γ_o . Sie wurden der Literatur entnommen [9].

Tabelle 2: Ergebnisse der Messungen des stöchiometrischen mittleren molalen Aktivitätskoeffizienten von NaCl in $3,623 \cdot 10^{-3}$ molaler wässriger RSA-Lösung.

$\frac{m_{\text{NaCl}}}{\text{mol} \cdot \text{kg}^{-1}}$	Zahl der Messungen	$\frac{(a_{\pm})_{E=0}}{\text{mol} \cdot \text{kg}^{-1}}$	γ_o	γ
(1)	(2)	(3)	(4)	(5)
0,01	3	0,00493 $\pm 0,00002$	0,903	0,493 $\pm 0,002$
0,02	1	0,0121	0,872	0,607
0,03	5	0,0190 $\pm 0,0004$	0,850	0,634 $\pm 0,013$
0,05	4	0,0334 $\pm 0,0004$	0,820	0,668 $\pm 0,007$
0,07	3	0,0480 $\pm 0,0004$	0,800	0,686 $\pm 0,005$
0,10	3	0,0692 $\pm 0,0008$	0,777	0,692 $\pm 0,008$
0,20	1	0,141	0,735	0,709
0,30	3	0,209 $\pm 0,000$	0,709	0,696 $\pm 0,000$
0,50	4	0,342 $\pm 0,001$	0,681	0,683 $\pm 0,001$

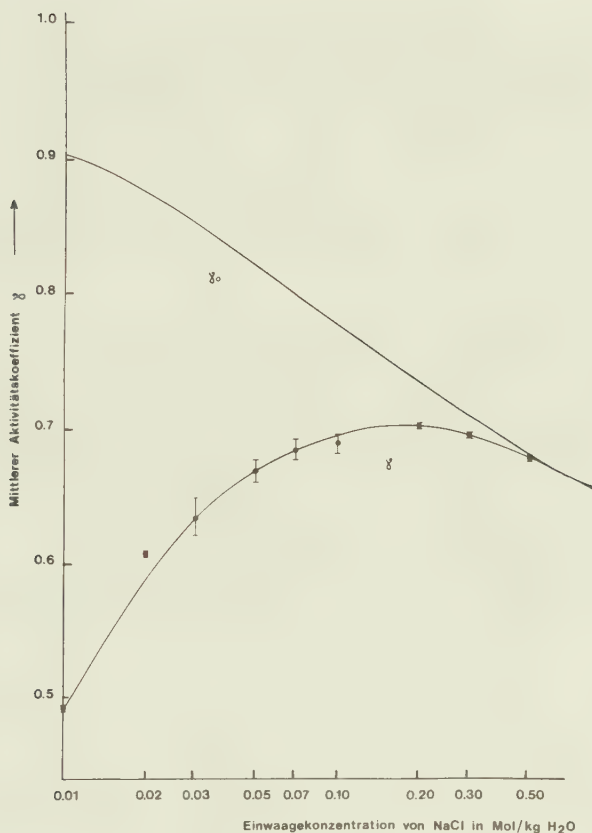


Abb. 4: Stöchiometrischer mittlerer molaler Aktivitätskoeffizient γ von NaCl in $3,623 \cdot 10^{-3}$ molaler RSA-Lösung in Abhängigkeit von der molalen NaCl-Konzentration m_{NaCl} in Mol pro Kilogramm Gesamtwasser. Zum Vergleich: der mittlere molale Aktivitätskoeffizient von NaCl, γ_0 , in reinen NaCl-Lösungen.

| : Mittelwert und Standard-Abweichung der Meßpunkte.

Die graphische Darstellung zeigt, daß der stöchiometrische mittlere Aktivitätskoeffizient γ durch Proteineinwirkung bei der niedrigsten NaCl-Konzentration um ca. 45 % unter dem Vergleichswert bei reiner NaCl-Lösung, γ_0 , liegt; er steigt jedoch mit zunehmender NaCl-Konzentration an und erreicht etwa bei 0,05 m NaCl den gleichen Wert. Bereits bei 0,1 m NaCl beträgt die Abweichung nur noch ca. 10 %.

Für die Salzkonzentration von 0,1 m stehen Vergleichswerte anderer Autoren zur Verfügung, die gleichartige Messungen mit verschiedenen Salzen in hochkonzentrierten RSA- bzw. Haemoglobinlösungen durchgeführt haben. Sie sind in Tab. 3 zusammengefaßt, wobei einige Werte durch Interpolation gefunden wurden. Zur Verdeutlichung der allein vom Proteinpolyion ausgehenden Wirkung wurde γ durch γ_0 dividiert, sodaß die Wechselwirkung der Salzionen untereinander in diesen Werten nicht mit enthalten ist.

Tabelle 3: Stöchiometrische mittlere molale Aktivitätskoeffizienten von (1,1)-Salzen in konzentrierten Proteinlösungen.
(Salzkonzentration: 0,1 Mol pro Kilogramm Wasser)

Protein (isoion.) Gewichts-%	Salz (m= 0,10 mol/kg)	γ/γ_0	Autor
RSA 20 %	NaCl	0,894	vorliegende Arbeit
"	KCl	0,905	PFISTER [37]
"	LiCl	0,887	REBOIRAS [42]
"	RbCl	0,900	
"	CsCl	0,898	
"	NaCl	0,892	
Hb 20 %	KCl	1,012	MENGES [29]
"	NaCl	1,054	RAU [41]
"	KCl	0,984	BAUER [5]
"	LiCl	1,006	
"	RbCl	1,002	
"	CsCl	1,002	
"	KF	1,013	SCHMID [48]
"	KBr	0,979	
"	KJ	0,936	
"	KNO	0,949	
Hb 35 %	KCl	1,018	MENGES [29]
"	NaCl	1,097	RAU [41]
"	NaCl	1,027	TRETTNER [58]
"	LiCl	0,998	BAUER [5]
"	KCl	1,005	
"	RbCl	1,020	
"	CsCl	1,017	
"	KF	1,036	SCHMID [48]
"	KBr	0,970	
"	KJ	0,885	
"	KNO	0,923	

Wie sich zeigt, liegt der Quotient γ/γ_0 bei Werten zwischen 0,885 und 1,036; die Anwesenheit des Proteins bewirkte also trotz hoher Konzentration auch bei verschiedenen anderen (1,1)-Salzen der Konzentration 0,10 Mol pro Kilogramm Wasser eine Abweichung des jeweiligen Aktivitätskoeffizienten um nicht mehr als 12 Prozent vom Aktivitätskoeffizienten des gleichen Salzes in reiner Lösung. Der Einfluß des Proteins auf die Salzionen ist also in keinem Falle so hoch, daß man von einer weitgehenden "Bindung" der kleinen Ionen sprechen könnte. Aus Tabelle 3 geht weiterhin hervor, daß die Wechselwirkung zwischen Hämoglobin und dem Salz hauptsächlich von der Art der Anionen abhängt; die Unterschiede der Werte bei gleichen Anionen und verschiedenen Kationen sind wesentlich geringer als diejenigen bei gleichen Kationen und verschiedenen Anionen. Auch beim Hb-Molekül scheint also - ähnlich wie beim RSA-Molekül (s.S. 22), - eine Anionenbindung vorzuliegen, deren Quantität sich nach der Ionensorte richtet.

Der nur geringe Unterschied der Werte für 20 %iges und 35 %iges Hämoglobin täuscht ein weitgehendes Fehlen von Hb-Salz-Wechselwirkungen vor. Es handelt sich hier jedoch um verschiedene Wirkungskomponenten des Hämoglobins, die von der Hb-Konzentration abhängen, sich bei der vorliegenden Salzkonzentration jedoch größtenteils aufheben (siehe TRETTER, Dissertation [58]).

Inwieweit die Beeinflussung der Salzionen von der Art des Proteins abhängt, zeigt die vergleichende Darstellung der in dieser Arbeit gefundenen Werte mit denen von TRETTER [58] , der bei seinen Messungen statt des hier verwendeten RSA eine 36,52 %ige Hämoglobininlösung wählte.

Tab. 4: Vergleich der Quotienten γ/γ_0 für NaCl in 20 %igen RSA- (vorliegende Arbeit) und 36,52 %igen Hämoglobin-Lösungen (TRETTER [58]).

$\frac{m_{NaCl}}{mol \cdot kg^{-1}}$	γ/γ_0 für 36,52% Hb	γ/γ_0 für 20% RSA
0,01	1,000	0,545
0,03	1,005	0,745
0,05	1,066	0,814
0,07	1,018	0,857
0,10	1,027	0,894
0,30	1,059	0,981
0,50	1,064	1,002

Aus Tabelle 4 ist ersichtlich, daß die Werte für Hämoglobin trotz der wesentlich höheren Proteinkonzentration deutlich über denen für RSA liegen. Ursache hierfür ist die unterschiedliche Wechselwirkung der beiden Proteine mit den Anionen, die vom RSA-Molekül offensichtlich in stärkerem Maße gebunden werden (s. 4.2).

4. DISKUSSION

Laut Definition (S. 32 und Gl. (19)) enthält γ außer dem "wahren" Einfluß des Proteins auf die "freien" Na^+ - und Cl^- -Ionen auch alle Effekte, durch die die "wahre" Konzentration der Ionen von den Einwaagekonzentrationen abweicht. Zur Klärung der Frage, durch welche physikalischen Mechanismen der Einfluß des Protein-Polyions auf die Aktivität und damit definitionsgemäß auf den stöchiometrischen mittleren Aktivitätskoeffizienten des Salzes bedingt ist, sind folgende Möglichkeiten zu diskutieren:

- 1) Die Bindung von H_2O -Molekülen an RSA-Moleküle, wodurch die effektive NaCl -Molalität durch Verringerung des freien Lösungsraumes erhöht wird, wenn angenommen wird, daß dieses "gebundene Wasser" dem freien Lösungsraum verloren geht ("non solvent water" [11, 12, 14]). Da hierdurch aber der Aktivitätskoeffizient erhöht werden müßte, kann dieser Mechanismus nicht allein wirksam sein.
- 2) Der Einfluß der spezifisch-chemischen Cl^- -Bindung an das RSA-Molekül; nach den Untersuchungen von SCATCHARD [44, 47] hat das RSA-Molekül die Eigenschaft, Cl^- -Ionen chemisch zu binden, während Kationen nicht gebunden werden. [52]
- 3) Der vom RSA-Molekül ausgehende elektrostatische Effekt; dieser läßt sich durch ein elektrisches Monopolfeld erklären, das ausschließlich durch die spezifisch gebundenen Cl^- -Ionen erzeugt wird, da, wie bereits in Abschnitt 2.2 ausgeführt, in isoionischen RSA-Lösungen sonst praktisch keine Überschußladungen auf dem RSA-Molekül vorhanden sind. Ein zusätzlicher elektrosta-

tischer Einfluß durch die etwa 100 positiven und 100 negativen Ladungen ist als Multipolfeld mit entsprechend steilem Feldstärkeabfall mit dem Abstand vom Molekül vernachlässigbar, wenn man von einer gleichmäßigen Ladungsverteilung auf der Oberfläche des RSA-Moleküls ausgeht.

Formal läßt sich γ demnach in drei Faktoren aufschlüsseln:

$$\gamma = \gamma_w \cdot \gamma_{el} \cdot \gamma_v \quad (20)$$

wobei	γ_w	den Einfluß der Wasserbindung an das RSA-Molekül,
	γ_v	den Einfluß der Cl^- -Ionenbindung an das RSA-Molekül und
	γ_{el}	den Einfluß des elektrostatischen Feldes der Ladungen auf dem RSA-Molekül auf die kleinen Ionen, und die Wechselwirkungen der kleinen Ionen untereinander berücksichtigt.

Diese drei Faktoren sollen im folgenden qualitativ und quantitativ untersucht werden.

4.1 Berücksichtigung der Protein-Wasser-Wechselwirkung

Protein-Polyionen haben bekanntlich durch ihre positiven und negativen Ladungsgruppen und auch durch nichtpolare Gruppen auf ihrer Oberfläche die Eigenschaft, mit den Wasserdipolen in Wechselwirkung zu treten, indem Wassermoleküle in nächster Umgebung des Proteins gebunden werden. Dieses "gebundene Wasser" umgibt das Proteinmolekül mantelförmig und geht als "proteineigenes" Wasser dem Lösungsraum verloren, wenn man von der Annahme ausgeht, daß es keine Na und Cl -Ionen enthält ("non-solvent-water" [11, 12, 14, 51]). Die in die RSA-Lösung eingewogene Menge NaCl muß also auf das verbleibende "freie Wasser" bezogen werden; die effektive Molalität der NaCl-Lösung berechnet sich dann aus der Gleichung (21):

$$m^{(w)} = \frac{m}{(1 - \eta \cdot m_{RSA})} \quad (21)$$

wobei	$m^{(w)}$	die Ionenkonzentration in Mol pro Kilogramm "freies Wasser",
	m	die Ionenkonzentration in Mol pro Kilogramm Gesamtwasser,
	η	die mittlere Menge "gebundenes Wasser" in Kilogramm pro Mol RSA und
	m_{RSA}	die RSA-Konzentration in Mol pro Kilogramm Wasser bedeutet.

Eingesetzt in Gl. (19) erhält man:

$$\gamma = \frac{(a_{\pm}^i)_{E=0}}{m_{NaCl}^{(w)}} \cdot \frac{1}{(1 - \eta \cdot m_{RSA})} \quad (22)$$

Durch den Vergleich mit Gl. (19) und Gl. (20) wird ersichtlich, daß

$$\frac{1}{(1 - \eta_{\text{RSA}})} = \gamma_w \quad (23)$$

ist, während der verbleibende Ausdruck in Gl. (22) das Produkt der Faktoren γ_v und γ_{el} darstellt.

In der Literatur werden auf Grund verschiedener Meßmethoden für das gebundene Wasser Werte zwischen 0,2 und 0,5g pro Gramm trockenes RSA [1, 2, 4, 6, 10, 18, 30, 43] angegeben. Hier wurden 0,4 Gramm gebundenes Wasser pro Gramm RSA angenommen, wobei η gleich 27,6 Kilogramm Wasser pro Mol RSA wird, was einem Wassermantel von ein bis zwei Molekülschichten H_2O um das RSA-Molekül entspricht. Damit ergibt sich nach Gl. (23) bei der verwendeten RSA-Konzentration von $3,623 \cdot 10^3$ Mol pro Kilogramm Wasser für γ_w der Wert 1,111. Da die RSA-Konzentration bei allen Messungen konstant blieb, geht dieser Wert als Konstante in Gl. (20) ein:

$$\gamma = 1,111 \cdot \gamma_{el} \cdot \gamma_v \quad (24)$$

Somit verbleiben γ_v und γ_{el} als Maß des "direkten" Einflusses des RSA-Moleküls auf die Salzionen und der Salzionen aufeinander:

$$\gamma_{el} \cdot \gamma_v = \gamma_p \quad (25)$$

4.2 Berücksichtigung der spezifischen Cl^- -Ionenbindung an das RSA-Molekül.

Durch die spezifische Bindung von Cl^- -Ionen am RSA-Molekül [44, 47] wird die Konzentration an freien Cl^- -Ionen in der RSA-NaCl-Lösung kleiner als die Einwaagekonzentration, was auch gemäß Gl. (4) eine Erniedrigung der mittleren Aktivität des Salzes zur Folge haben muß. Die Zahl der im Mittel pro RSA-Molekül gebundenen Cl^- -Ionen, ν_{Cl^-} , ist sowohl von der Konzentration der Cl^- -Ionen im "freien" Lösungswasser, als auch von der RSA-Molalität abhängig; letztere ist wieder konstant. Rechnerisch ergibt sich:

$$m_{\text{Cl}^-}^{(w,f)} = m_{\text{Cl}^-}^{(w)} - \nu_{\text{Cl}^-} m_{\text{RSA}}^{(w)} = m_{\text{Cl}^-}^{(w)} \cdot \left[1 - \nu_{\text{Cl}^-} \cdot \frac{m_{\text{RSA}}^{(w)}}{m_{\text{Cl}^-}^{(w)}} \right] \quad (26)$$

wobei: $m_{\text{Cl}^-}^{(w,f)}$ die Konzentration der freien Cl^- -Ionen pro Kilogramm "freies" Wasser und
 $m_{\text{Cl}^-}^{(w)}$ die Konzentration der gesamten Cl^- -Ionen pro Kilogramm "freies" Wasser ist.

Für $m_{\text{Na}^+}^{(w,f)}$ gilt:

$$m_{\text{Na}^+}^{(w,f)} = m_{\text{Na}^+}^{(w)}, \quad (27)$$

da angenommen werden kann, daß keine Bindung von Na^+ -Ionen an das Protein erfolgt [52] .

Durch Einsetzen von Gl. (26), (27), (17) und (18) in Gl. (22) erhält man:

$$\gamma = \frac{(a_{\pm})_{\Gamma=0}}{\sqrt{\frac{m_{Na^+}^{(w,f)}}{m_{Na^+}^{(w)}} + \frac{m_{Cl^-}^{(w,f)}}{m_{Cl^-}^{(w)}}}} \cdot \sqrt{1 - \nu_{Cl^-} \cdot \frac{m_{RSA}^{(w)}}{m_{Cl^-}^{(w)}}} \cdot \frac{1}{(1 - \eta \cdot m_{RSA})} \quad (28)$$

Vergleicht man diese Formel wieder mit Gl. (19) und (20), so wird ersichtlich, daß

$$\gamma_v = \sqrt{1 - \nu_{Cl^-} \cdot \frac{m_{RSA}^{(w)}}{m_{Cl^-}^{(w)}}} = \sqrt{1 - \nu_{Cl^-} \cdot \frac{m_{RSA}}{m_{Cl^-}}} \quad (29)$$

ist.

Zur Berechnung von γ_v muß für jede vorkommende Lösungszusammensetzung ν_{Cl^-} bekannt sein. Nach den Messungen und Berechnungen von SCATCHARD [44, 47] hängt ν_{Cl^-} von der Konzentration der im Bindungsgleichgewicht mit den RSA-Molekülen vorhandenen "freien" Cl^- -Ionen und der Bilanzladung der RSA-Moleküle ab. Solange die RSA-Konzentration sehr klein gegenüber der Cl^- -Gesamtkonzentration bleibt, kann ν_{Cl^-} als unabhängig von der Proteinkonzentration behandelt werden; zur Berechnung von γ_v können dann die von SCATCHARD bei niedrigen RSA-Konzentrationen (2 - 3 Gewichtsprozent) bestimmten ν_{Cl^-} -Werte bei der entsprechenden Cl^- -Konzentration verwendet werden. Im vorliegenden Fall ist die RSA-Konzentration jedoch hoch, sodaß die von SCATCHARD bestimmten ν_{Cl^-} -Werte, besonders bei den niedrigen NaCl-Konzentrationen nicht mehr gelten. (Beispiel: Würde man bei 0,01 m NaCl den SCATCHARD'-SCHEN Wert für $\nu_{Cl^-}=4$ einsetzen, so erhielte man unter der Wurzel in Gl. (27)

einen negativen Ausdruck!). Es wurde daher der Einfluß der Proteinkonzentration auf ν_{Cl^-} nach den von SCATCHARD berechneten Bindungskonstanten und der Zahl der Bindungsstellen am RSA-Molekül [44, 47] berücksichtigt. Die Rechnung [39] ergab folgende in Tabelle 5 aufgeführten ν_{Cl^-} -Werte für eine RSA-Konzentration von 20 Gewichtsprozent (zum Vergleich sind zwei SCATCHARD'SCHE Werte für niedrige RSA-Konzentrationen mit angegeben):

Tabelle 5: Zahl der im Mittel pro RSA-Molekül gebundenen Cl^- -Ionen ν_{Cl^-} bei $3,623 \cdot 10^{-3}$ molaler RSA-Lösung.

$\frac{m_{NaCl}}{mol \cdot kg^{-1}}$	ν_{Cl^-}	$\nu_{Cl^-} (SCATCHARD)$
0,01	2,1	4,05
0,02	3,6	-
0,03	4,7	-
0,05	6,3	-
0,07	7,4	-
0,10	8,6	9,16
0,2	11,0	-
0,3	12,6	-
0,5	14,6	-

Wäre der vom Protein ausgehende elektrostatische Einfluß gleich Null, so wäre in Gl. (25) γ_{Cl^-} mit γ_0 gleichzusetzen. Das Produkt aus γ_v und γ_0 beschreibt dann allein die durch die Cl^- -Bindung verursachte Änderung des Aktivitätskoeffizienten; weiterhin erlaubt es im Vergleich mit γ_p eine deutliche Hervorhebung des vom Protein ausgehenden elektrostatischen Effektes. Das Produkt aus γ_v und γ_0 geht daher als γ' in die folgende Betrachtung ein:

$$\gamma' = \gamma_v \cdot \gamma_0 \quad (30)$$

4.3 Die elektrostatische Wechselwirkung des RSA-Moleküls mit den Na^+ und Cl^- -Ionen.

Aus Gl. (28) geht für den elektrostatischen Aktivitätskoeffizienten hervor:

$$\gamma_{\text{el}} = \frac{(a_{\pm}^{\text{I}})_{\xi=0}}{\sqrt{m_{\text{Na}^+}^{(w,t)} \cdot m_{\text{Cl}^-}^{(w,t)}}} \quad (31)$$

Anders ausgedrückt, unter Verwendung von Formel (20), (28) und (29):

$$\gamma_{\text{el}} = \frac{(a_{\pm}^{\text{I}})_{\xi=0}}{m_{\text{NaCl}}} \cdot \frac{(1 - \eta \cdot m_{\text{RSA}})}{\sqrt{1 - \nu_{\text{Cl}^-} \cdot \frac{m_{\text{RSA}}}{m_{\text{Cl}^-}}}} \quad (32)$$

Nach dieser Formel konnten die Werte für γ_{el} aus den gemessenen mittleren molalen Aktivitätskoeffizienten berechnet werden.

Zur Darstellung des elektrostatischen Einflusses, der allein vom Proteinpolyion ausgeht, also ohne Berücksichtigung der Wechselwirkung der kleinen Ionen untereinander, wird γ_{el} durch γ_0 dividiert:

$$\frac{\gamma_{\text{el}}}{\gamma_0} = \gamma_{\text{el},p} \quad (33)$$

Tabelle 6 und Abbildung 5 zeigen die verschiedenen Aktivitätskoeffizienten im Vergleich.

Wie die Kurvenbetrachtung zeigt, ist der alleinige Einfluß des Proteins nach der Korrektur des Wasserbindungsanteils (γ_p) auf die Na^+ - und Cl^- -Ionen erheblich größer, als aus dem gemessenen Aktivitätskoeffizienten ersichtlich ist. Durch die Verringerung des freien Lösungsraumes durch die Wasserbindung an das RSA-Molekül wird also ein Teil der Aktivitätsminderung der Na^+ - und Cl^- -Ionen durch das RSA-Molekül kompensiert.

Nach Gl. (25) ist γ_p das Produkt aus γ_v und γ_{el} . Im Vergleich zu γ' , dem Produkt aus γ_v und γ_o , fällt der geringe Unterschied zwischen beiden Kurven auf. Offensichtlich ist der vom Protein ausgehende elektrostatische Einfluß nicht groß im Vergleich zur elektrostatischen Wechselwirkung der kleinen Ionen untereinander allein. Dies wird auch durch den Vergleich der Kurven γ_o und γ_{el} deutlich, die beide, wie auch die Kurven von γ_p und γ' , im unteren Konzentrationsbereich bis 0,05 m NaCl identisch sind; erst ab 0,07 m NaCl divergieren sie, laufen jedoch ab etwa 0,10 m NaCl in geringem Abstand annähernd parallel.

Der elektrostatische Einfluß des Proteins macht sich also erst ab etwa 0,07 m NaCl bemerkbar und scheint bereits ab 0,1 m NaCl einen konstanten Wert anzunehmen. Dies wird durch die Kurve $\gamma_{el,p}$ noch weiter verdeutlicht, da sich hier nach Berücksichtigung von γ_o der prozentuale quantitative Wert für die Erniedrigung

Tabelle 6: Einwaagekonzentrationen m_{NaCl} und die dazugehörigen mittleren Aktivitätskoeffizienten (siehe Text). Zum Vergleich der jeweilige Aktivitätskoeffizient reiner NaCl-Lösungen γ° .

m_{NaCl} mol kg^{-1}	γ° (1)	γ (2)	γ° (3)	γ° (4)	γ' (5)	γ_a (6)	$\gamma_{el,p}$ (7)
0,01	0,903	0,493	0,444	0,489	0,442	0,908	1,00(4)
0,02	0,872	0,607	0,546	0,590	0,514	0,926	1,0(62)
0,03	0,850	0,634	0,571	0,658	0,559	0,868	1,0(21)
0,05	0,820	0,668	0,601	0,737	0,604	0,815	0,994
0,07	0,800	0,686	0,617	0,786	0,628	0,786	0,984
0,10	0,777	0,692	0,622	0,830	0,645	0,750	0,965
0,20	0,735	0,709	0,634	0,895	0,657	0,709	0,966
0,30	0,709	0,696	0,626	0,921	0,654	0,680	0,958
0,50	0,681	0,683	0,614	0,945	0,644	0,650	0,953

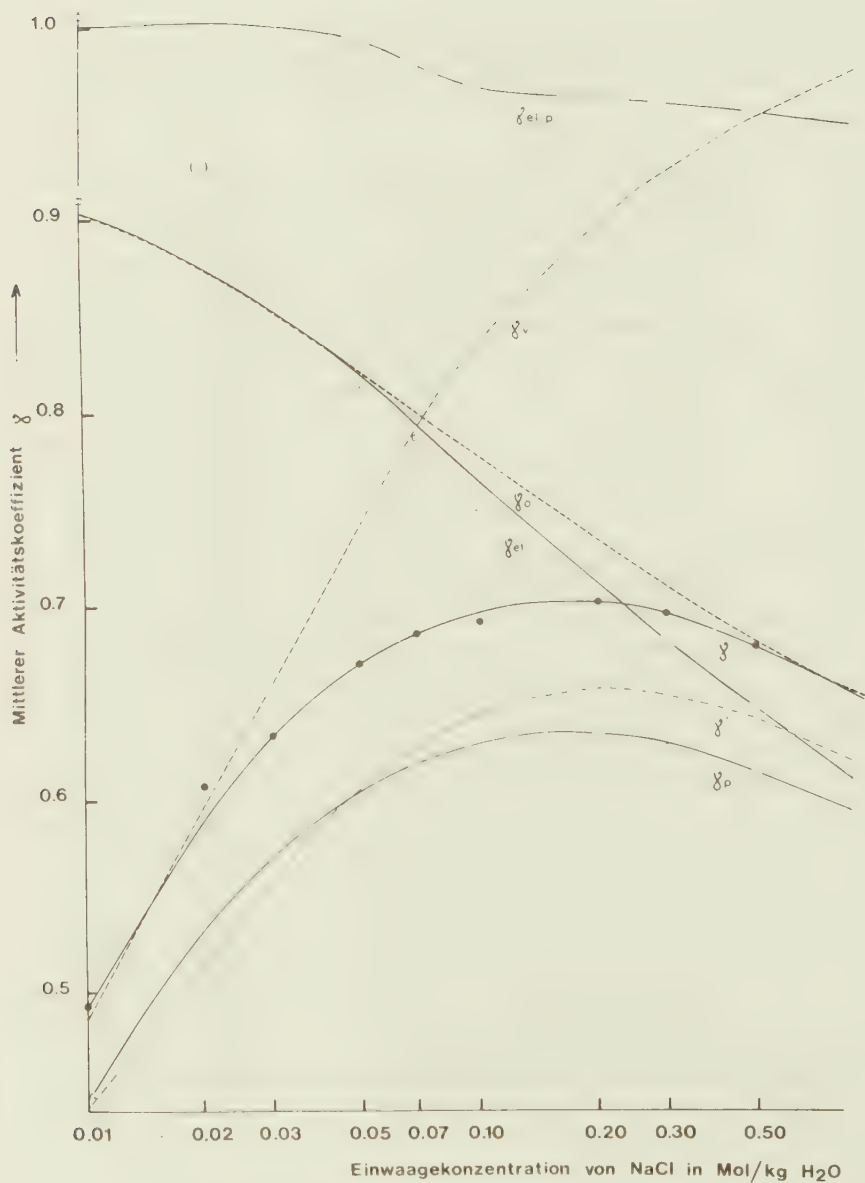


Abb. 5: In Tabelle 6 aufgeführte und in Kapitel 4 erläuterte mittlere Aktivitätskoeffizienten in Abhängigkeit vom dekadischen Logarithmus der NaCl-Einwaagekonzentrationen

Mit: γ_o Aktivitätskoeffizient von NaCl in reinen NaCl-Lösungen [9]

γ stöchiometrischer mittlerer Aktivitätskoeffizient

γ_p Aktivitätskoeffizient nach Berücksichtigung der Wasserbindung (s. Gl. (25)); beschreibt den "direkten" Einfluß des RSA-Moleküls auf die Na^+ und Cl^- -Ionen und den der Salzionen aufeinander.

γ_v Aktivitätskoeffizient nach Berücksichtigung der Wasserbindung und des elektrostatischen Einflusses des Proteins; beschreibt den alleinigen Einfluß der spezifischen Cl^- -Ionenbindung an das RSA-Molekül (s. Gl. (29)).

γ' Einfluß der spezifischen Cl^- -Ionenbindung und Wechselwirkung der kleinen Ionen untereinander (s. Gl. (30)); im Gegensatz zu γ_p bleibt hier der vom Protein ausgehende elektrostatische Einfluß unberücksichtigt.

γ_{el} elektrostatischer Aktivitätskoeffizient; beschreibt den vom Protein ausgehenden elektrostatischen Einfluß und die elektrostatische Wechselwirkung der kleinen Ionen untereinander (s. Gl. (31) und (32)).

$\gamma_{el,p}$ alleiniger elektrostatischer Einfluß des Proteins nach Berücksichtigung der Wechselwirkung der kleinen Ionen untereinander (s. Gl. (33)).

γ_w ist als konstanter Wert von 1,111 (s. Gl. (23) und Gl. (24)) hier nicht eingezeichnet.

des Aktivitätskoeffizienten durch den elektrostatischen Einfluß des Proteins direkt ablesen läßt: Sie beträgt ab 0,10 m NaCl nur 4 bis 5 %.

Wie bereits erläutert, wird die Veränderung von γ_a durch das Proteinmolekül, $\gamma_{el,p}$, von dessen Bilanzladung Z_{RSA} verursacht, die durch die spezifisch gebundenen Cl^- -Ionen bedingt ist. Die Kurvenbetrachtung zeigt, daß sich dieser vom Protein ausgehende elektrostatische Effekt erst ab etwa 0,07 m NaCl entsprechend 7 pro RSA-Molekül gebundenen Cl^- -Ionen (vergl. Tab. 5) deutlich bemerkbar macht, während die relativ starke Erniedrigung des stöchiometrischen Aktivitätskoeffizienten in den niedrigen Konzentrationsbereichen von 0,01 m bis 0,07 m NaCl fast ausschließlich durch die spezifische Cl^- -Bindung hervorgerufen wird. Trotz weiterer Zunahme der Bilanzladung der Polyionen durch spezifische Cl^- -Ionenbindung bei steigender NaCl-Konzentration findet ab etwa 0,10 m NaCl ($Z_{RSA} = -9$) keine weitere Zunahme des elektrostatischen Einflusses statt; bis 0,50 m NaCl ($Z_{RSA} = -15$) bleibt die Erniedrigung des Aktivitätskoeffizienten durch den elektrostatischen Einfluß annähernd konstant bei 4 bis 5 %, obwohl die Bilanzladung der Proteinpolyionen weiter bis auf ca. 15 negative Elementarladungen zunimmt. Ursache für dieses Verhalten ist ein sekundärer Effekt, der durch die mit steigender Salzkonzentration zunehmende Abschirmwirkung der "Gegenionenwolke" um das Polyion herum bedingt ist [19, 28, 31]. Im unteren Salzkonzentrationsbereich ist diese Abschirmwirkung kleiner, gleichzeitig jedoch auch die Bilanzladung der Polyionen. Es handelt sich hier also um eine über die Salzkonzentra-

tion vermittelte Kopplung zweier Effekte: an sich müßte der elektrostatische Einfluß der Polyionen mit steigender Ladungszahl zunehmen. Da jedoch diese als Folge der zunehmenden Salzkonzentration steigt, nimmt gleichzeitig die entgegengesetzte Wirkung der Abschirmung durch die "Gegenionenwolke" zu.

Vergleichbare Verhältnisse finden sich beim Hb-Molekül, wie die Untersuchungen von TRETTER [58] zeigen, der die gleichen Messungen in einer 36,52 gewichtsprozentigen isoionischen Hämoglobininlösung durchführte. Im Bereich zwischen 0,01 m NaCl und 0,5 m NaCl zeigt der elektrostatische Aktivitätskoeffizient einen qualitativ sehr ähnlichen Kurvenverlauf; auch die quantitativen Unterschiede sind gering: die Werte für den elektrostatischen Aktivitätskoeffizienten lagen dort zwischen 0 % (bei 0,01 m NaCl) bzw. 13 % (bei 0,5 m NaCl) niedriger als in reinen NaCl-Lösungen entsprechender Konzentration.

Gute Übereinstimmung der Werte für den elektrostatischen Aktivitätskoeffizienten finden sich auch beim Vergleich anderer Messungen in 20 %iger RSA-Lösung mit verschiedenen Salzen einer Molalität von 0,1 Mol pro Kilogramm Wasser, die abschließend in Tabelle 7 dargestellt sind.

Tabelle 7: Vergleich der elektrostatischen Aktivitätskoeffizienten $\gamma_{el,p}$ verschiedener Salze (0,10 molal) in 20 %iger RSA-Lösung.

Salz (0,10 m)	$\gamma_{el,p} = \gamma_{el} / \gamma_o$	Autor
NaCl	0,969	vorliegende Arbeit
KCl	0,973	PFISTER [37]
LiCl	0,960	REBOIRAS [42]
RbCl	0,977	
CsCl	0,975	

5. FEHLERBETRACHTUNG

Für den elektrostatischen Aktivitätskoeffizienten γ_{el} läßt sich aus der Bestimmungsgleichung (Gl. (32)) nach dem Fehlerfortpflanzungsgesetz der relative mittlere Fehler berechnen:

$$\frac{\sigma \gamma_{\text{el}}}{\gamma_{\text{el}}} = \pm \left[\left[\frac{\sigma (a_{\pm}^{\text{I}})_{E=0}}{(a_{\pm}^{\text{I}})_{E=0}} \right]^2 + \left[\frac{\sigma m_{\text{NaCl}}}{m_{\text{NaCl}}} \right]^2 + \left[\frac{\sigma \gamma_w}{\gamma_w} \right]^2 - \left[\frac{\sigma \gamma_v}{\gamma_v} \right]^2 \right]^{\frac{1}{2}} \quad (34)$$

Nach Gl. (10) ergibt sich für $\frac{\sigma (a_{\pm}^{\text{I}})_{E=0}}{(a_{\pm}^{\text{I}})_{E=0}}$:

$$\frac{\sigma (a_{\pm}^{\text{I}})_{E=0}}{(a_{\pm}^{\text{I}})_{E=0}} = \frac{2,303 \cdot \sigma E}{A} \quad (35)$$

A bezeichnet hierbei die Steigung der Titrationsgeraden; sie lag zwischen 76 und 113 mV/Dekade (s. Tab. 1). Als relativer Fehler ergibt sich somit bei $\sigma E = 0,3$ mV (s. S. 28):

$$\pm 0,006 \leq \frac{\sigma (a_{\pm}^{\text{I}})_{E=0}}{(a_{\pm}^{\text{I}})_{E=0}} \leq \pm 0,009$$

Für die NaCl-Einwaagekonzentration $m_{\pm}$ (s. Seite 16) erhält man den maximalen relativen Fehler:

$$\frac{\delta m_{\text{NaCl}}}{m_{\text{NaCl}}} = 0,001$$

Nach Gl. (23) und (24) ergibt sich für $\frac{\delta \gamma_w}{\gamma_w}$:

$$\frac{\delta \gamma_w}{\gamma_w} = \pm (\gamma_w - 1) \frac{\delta m_{\text{RSA}}}{m_{\text{RSA}}} \quad (36)$$

Bei der Einstellung der RSA-Molalität m_{RSA} mittels der Trockengewichtsbestimmung ist der relative Fehler $\pm 0,005$ (s. Seite 16). Somit errechnet sich:

$$\frac{\delta \gamma_w}{\gamma_w} = \pm 5 \cdot 10^{-4}$$

Für die Berechnung von Gl. (34) kann dieser Wert vernachlässigt werden.

Der mittlere relative Fehler von γ_ν ergibt sich aus Gl. (29):

$$\frac{\delta \gamma_\nu}{\gamma_\nu} = \pm \frac{(1 - \gamma_\nu^2)}{2 \gamma_\nu^2} \cdot \left[\left[\frac{\delta m_{\text{RSA}}}{m_{\text{RSA}}} \right]^2 + \left[\frac{\delta m_{\text{Cl}^-}}{m_{\text{Cl}^-}} \right]^2 \right]^{\frac{1}{2}} \quad (37)$$

Dabei wird ν_{Cl^-} (s. Gl. (29)) als nicht mit Fehler behaftet behandelt [39] (vergl. S. 44). Man erhält mit den oben angegebenen Werten:

$$3 \cdot 10^{-4} \leq \frac{\delta \gamma_\nu}{\gamma_\nu} \leq 8 \cdot 10^{-3}$$

Eingesetzt in Gl. (34) ergibt sich aus diesem Einzelwerten ein relativer mittlerer Gesamtfehler des mittleren "elektrostatischen" Aktivitätskoeffizienten von

$$\frac{\delta \gamma_{\text{el}}}{\gamma_{\text{el}}} = \pm 0,01$$

Dieser Wert stimmt gut mit der gefundenen Reproduzierbarkeit der Ergebnisse (s. Tab. 2, Seite 33) überein.

6. ZUSAMMENFASSUNG UND SCHLUSFOLGERUNG

Als Beitrag zum besseren Verständnis des Zustandes der kleinen Ionen im Zytoplasma lebender Zellen wurde in der vorliegenden Arbeit der mittlere Aktivitätskoeffizient von NaCl in NaCl-Rinderserumalbumin-Lösungen bestimmt. Die RSA-NaCl-Lösung diente als Modelllösung des Zytoplasmas und war in ihrer Zusammensetzung den physiologischen Verhältnissen angeglichen: Der Gewichtsanteil des RSA betrug 20 %, die NaCl-Konzentration wurde zwischen 0,01 und 0,50 molal variiert, sodaß der physiologische Bereich von 0,1 bis 0,3 molal mit eingeschlossen war.

Die Ergebnisse zeigten im Vergleich mit reinen NaCl-Lösungen gleicher Konzentration eine Erniedrigung des stöchiometrischen Aktivitätskoeffizienten von NaCl, die jedoch nur in den niedrigen Konzentrationsbereichen deutlich ausgeprägt war, während sie im physiologischen Bereich nicht mehr als 10 % (bei 0,10 m NaCl) betrug. Bei NaCl-Konzentrationen über 0,3 Mol/l war eine Erniedrigung des Aktivitätskoeffizienten unter RSA-Einfluß nicht mehr nachweisbar. Demnach kann angenommen werden, daß der größte Teil der Ionen in RSA-NaCl-Lösungen bei physiologischen Konzentrationsbereichen als in freier Form vorliegend behandelt werden kann. Das gleiche Ergebnis fanden andere Autoren bei anderen konzentrierten Protein-Salzlösungen (vergl. Tab. 3).

Als Ursache für die Erniedrigung des Aktivitätskoeffizienten wurden verschiedene Wechselwirkungsmechanismen zwischen Protein- und Salzionen diskutiert. Im Vordergrund steht dabei die spezifische Cl^- -Ionenbindung an das RSA-Molekül,

wodurch nicht nur die Zahl der freien Cl^- -Ionen verringert wird, sondern auch durch die dabei entstehenden negativen Ladungen auf der Proteinoberfläche ein elektrostatischer Einfluß des Proteins auf die Salzionen entsteht. Demgegenüber wirkt sich teilweise kompensierend der Abschirmeffekt der freien Ionen in unmittelbarer Umgebung des Proteins, und die Verringerung des freien Lösungsraumes durch Wasserbindung an das RSA-Molekül aus.

Zahlreiche Untersuchungen [32-36, 8, 18, 22, 30] ergaben, daß sich das Zytoplasma der lebenden Zelle in seinen elektrischen und thermodynamischen Eigenschaften nicht wesentlich von konzentrierten Makromolekül-Salzlösungen unterscheidet. Die Ergebnisse dieser Arbeit können daher auch auf die Verhältnisse im Zytoplasma lebender Zellen angewandt werden.

Für die der hier vertretenen Auffassung gegenüberstehende Sorptionstheorie [57] und "association-induction"-Hypothese [23-26], die beide eine Bindung des größten Teiles der Ionen im Zytoplasma fordern, konnten an Hand der vorliegenden Untersuchungen keine Anhaltspunkte gefunden werden.

LITERATUR-VERZEICHNIS

1. G.S. Adair, M.E. Adair: Proc.Roy.Soc. (London) A 90
(1947) 341
2. C.H. Amberg: J.Amer.Chem. Soc. 79 (1957), 3980
3. L.-O. Andersson: Biochim.Biophys.Acta 117 (1966), 115
4. E.L. Andronikashvili, G.N. Mrevlishvili, P.L. Privalov:
in loc. cit. 93 , p. 67
5. M. Bauer: Persönliche Mitteilungen
6. H.B. Bull, K. Breese: Arch.Biochem. Biophys. 128 (1968),
488
7. W.H. Bunch, G. Kallsen: Science 164 (1969), 1178
8. C.W. Carr: Ann. N.Y.Acad.Sci 148 (1968), 180
9. B.E. Conway: "Electrochemical Data", Elsevier Publ.Comp.,
Amsterdam, Houston, London. New York, 1952
10. D.J. Cox, V.N. Schumaker: J.Amer.Chem.Soc. 83 (1961), 2433
11. D.A.T. Dick: "Cell Water", Butterworth, London, 1966,
p. 36 ff.
12. D.L. Drabkin: J.Biol.Chem. 185 (1950), 231
13. J.F. Foster: in F.W. Putnam (ed.): "The Plasma Proteins",
Vol.I, Acad.Press, New York u. London 1960
p. 206 ff.
14. C.M. Gary-Bobo: J.Gen.Physiol. 50 (1967), 2547
15. E.A. Guggenheim: J.Phys.Chem. 33 (1929), 842
34 (1930), 1540 u. 1758
16. E.A. Guggenheim: "Thermodynamics", North-Holland Publ.Comp.,
Amsterdam, 1959, p. 386 ff.

17. R.W. Hartley jr., E.A. Peterson, H.A. Sober: Biochem. 1
(1962), 60
18. G. Hasl, H. Pauly: Biophysik 7 (1971), 283
19. N. Ise: Adv.Polym.Sci. 7 (1971), 536
20. J. Janatová, J.K. Fuller, M.J. Hunter: J.Biol.Chem.
243 (1968), 3612
21. J. Janatová, O. Mikš, J. Sponar: Coll.Czech.Chem.Comm.
33 (1968), 788
22. M.J. Kushmerick, R.J. Podolsky: Science 166 (1969), 1297
23. G.N. Ling: "A Physical Theory of the Living State; The
Association-Induction Hypotheses", Blaisdell,
New York, 1962
24. G.N. Ling: Ann.N.Y.Acad.Sci. 125 (1965), 401
25. G.N. Ling, F.W. Cope: Science 163 (1969), 1335
26. G.N. Ling: Internatl.Rev.Cytology 26 (1969), 1
27. G.I. Loeb, H.A. Scheraga: J.Phys.Chem. 60 (1956), 1633
28. J.W. Lyons, L. Kotin: J.Amer.Chem.Soc. 87 (1965), 1670
29. G. Menges: Dissertation, Erlangen 1973
30. G.M. Mrevlishvili, P.L. Privalov: in L.P. Kayushin (Ed.)
"Water in Biological Systems", über-
setzt aus dem Russ., Consultants Bureau,
New York, 1969, p. 63
31. F. Oosawa, N. Imai, I. Kagawa: J.Polym. Sci. 13 (1954), 93
32. H. Pauly: Nature 183 (1959), 333
33. H. Pauly, H.P. Schwan: ONR Techn.Report 28, 1959, Univ.of
Pennsylvania, Electromed.Lab., The Moore School
of Electrical Engineering

34. H. Pauly: Biophysik 1 (1963), 143
35. H. Pauly, H.P. Schwan: Biophys.J. 6 (1966), 621
36. H. Pauly: in W. Beier (Ed.): "Physikalische Grundlagen der Medizin; Abhdlgn. aus der Biophysik" Heft 7, Edition Leipzig, 1967, p. 85
37. H. Pfister: Dissertation, Erlangen 1971
38. H. Pfister: Dipl.-Arbeit, Frankfurt a.M. 1963
39. H. Pfister: Persönliche Mitteilungen
40. F.W. Putnam: in H. Neurath (Ed.): "The Proteins", Vol.III, Acad.Press, New York u. London, 1965, Tab.I, p. 174, und Anmerkung (e), p. 176
41. H. Rau: Persönliche Mitteilungen
42. M.D. Reboiras: Persönliche Mitteilungen
43. D. Rosen: Trans.Farad.Soc. 59 (1963), 2178
44. G. Scatchard, I.H. Scheinberg, S.H. Armstrong: J.Amer.Chem. Soc. 72 (1950), 535 und 540
45. G. Scatchard: J.Amer.Chem.Soc. 75 (1953), 2883
46. G. Scatchard: in Shedlovsky (Ed.): "Electrochemistry in Biology and Medicine", J.Wiley & Sons, New York, 1955, p. 18
47. G. Scatchard; J.S. Coleman, A.L. Shen: J.Amer.Chem.Soc. 79 (1957), 12
48. W. Schmid: Dissertation, Erlangen 1976
49. K. Sollner: Ann.N.Y.Acad.Sci. 148 (1968), 154
50. P.G. Squire, P. Moser, C.T.O'Konski: Biochem. 7 (1968), 4261
51. J. Steinhardt, J.A. Reynolds: "Multiple Equilibria in Proteins", Acad.Press, New York u. London 1969 p. 154 ff.

- 52. loc.cit. 134 , p. 214 ff., 316 ff.
- 53. S.F. Sun: Arch.Biochem.Biophys. 129 (1969), 411
- 54. C. Tanford, S.A. Swanson, W.S. Shore: J.Amer.Chem.Soc. 77
(1955), 6414
- 55. C. Tanford, J.G. Buzzell, D.G. Rands, S.A. Swanson:
J.Amer.Chem.Soc. 77 (1955), 6421
- 56. C. Tanford, J.G. Buzzell: J.Phys.Chem. 60 (1956), 225
- 57. A.S. Troschin: "Problems of Cell Permeability", Pergamon
Press, Oxford, 1966
- 58. N. Tretter: Dissertation, Erlangen 1975

Herrn Prof. Dr. Dr. Pauly danke ich für die Überlassung des Themas und für die großzügige materielle Unterstützung bei der experimentellen Tätigkeit.

Besonders möchte ich Herrn Dr. Pfister für seine Hilfe bei der Anfertigung dieser Arbeit danken. Er war jederzeit bereit, mir mit seinem Wissen beizustehen und trachte viel Geduld und Zeit für zahlreiche Diskussionen über die während der Arbeit anfallenden Probleme auf.

Den Angehörigen des Institutes danke ich für die freundliche Atmosphäre, die den experimentellen Teil der Arbeit wesentlich erleichterte.

Lebenslauf

Am 25. Juni 1948 bin ich als Sohn des Industriekaufmannes Helmut Rämisch und seiner Ehefrau Marianne, geb. Skoda, in Münchberg/Ofr. geboren. Meine Volksschulpflicht erfüllte ich zunächst in Münchberg, später - bedingt durch Umsiedelung meiner Eltern - in Nürnberg und Erlangen. 1958 wurde ich in das Humanistische Gymnasium Fridericianum, Erlangen, aufgenommen, wo ich am 20.7.1967 das Zeugnis der Reife erhielt.

Im gleichen Jahr begann ich in Marburg/Lahn mit dem Studium der Medizin. Nachdem ich dort 1970 die ärztliche Vorprüfung abgelegt hatte, kehrte ich nach Erlangen zurück, wo ich am 24.1.1974 mein Studium mit dem Staatsexamen abschloß.

Meine Tätigkeit als Medizinalassistent begann ich am 1.4.1974 am Kreiskrankenhaus Ebermannstadt und beendete sie im April 1975 am Kreiskrankenhaus Naila. Nach zwischenzeitlichen Praxisvertretungen arbeite ich seit dem 1.10.1975 als Assistenzarzt in der Gynäkologischen Abteilung des Kreiskrankenhauses Neustadt/Aisch.

Copy-Center 2000

852 ERLANGEN · Obere Karlstr. 30
Tel. 09131-26197